

VU Research Portal

Therapeutic targets and biomarkers in lung cancer

Gallegos Ruiz, M.I.

2008

document version

Publisher's PDF, also known as Version of record

[Link to publication in VU Research Portal](#)

citation for published version (APA)

Gallegos Ruiz, M. I. (2008). *Therapeutic targets and biomarkers in lung cancer*. [PhD-Thesis - Research and graduation internal, Vrije Universiteit Amsterdam].

General rights

Copyright and moral rights for the publications made accessible in the public portal are retained by the authors and/or other copyright owners and it is a condition of accessing publications that users recognise and abide by the legal requirements associated with these rights.

- Users may download and print one copy of any publication from the public portal for the purpose of private study or research.
- You may not further distribute the material or use it for any profit-making activity or commercial gain
- You may freely distribute the URL identifying the publication in the public portal ?

Take down policy

If you believe that this document breaches copyright please contact us providing details, and we will remove access to the work immediately and investigate your claim.

E-mail address:

vuresearchportal.ub@vu.nl

NEDERLANDSE SAMENVATTING

NEDERLANDSE SAMENVATTING VOOR NIET-INGEWIJDEN

In gezonde personen is er een goede balans tussen cellen die delen en cellen die doodgaan. In sommige gevallen wordt deze balans verstoord en delen cellen sneller dan ze doodgaan. Door deze ongecontroleerde deling van cellen ontstaan ophopingen van cellen op specifieke plaatsen in het lichaam, een tumor, ook wel kanker genoemd. Kanker is een van de grootste doodsoorzaken in de westerse wereld. In Nederland is het, op hart- en vaatziekten na, de grootste doodsoorzaak.

De deling van cellen in gezonde personen is een nauwkeurig gereguleerd proces, deels vastgelegd in de kern van de cel. In de kern van de cel bevindt zich het erfelijk materiaal, DNA, dit ligt bij mensen verspreid over 22 chromosomen. Delen van het DNA (genen) worden afgeschreven als RNA. Het RNA vormt de code om eiwitten te produceren. Eiwitten zijn uiteindelijk verantwoordelijk voor het uitvoeren van verschillende processen in de cel. Wanneer er een fout zit in het DNA, het RNA of in een eiwit kan het hele proces van bijvoorbeeld celdeling verstoord raken, wat vervolgens kan resulteren in kanker.

Longkanker is het type kanker dat verantwoordelijk is voor het grootste aantal kanker gerelateerde sterftegevallen in de westerse wereld en in Azië. Patiënten kunnen worden behandeld door het wegsnijden van de tumor, soms wordt de hele long verwijderd. Er zijn echter vele gevallen waarin de toestand van de patiënt het niet toelaat een operatie te ondergaan. Ofwel omdat de patiënt niet fit genoeg is om met één long door te leven, en dus zou kunnen overlijden aan de operatie. Ofwel, omdat de longtumor in zo'n mate is doorgegroeid naar andere delen van het lichaam (is gemetastaseerd) dat het verwijderen van de tumorcellen niet mogelijk is door een operatie. In die gevallen wordt de patiënt behandeld met radiotherapie of chemotherapie. Deze vormen van therapie zorgen ervoor dat de deling van cellen wordt verstoord en dus de groei van de tumor wordt gehinderd. Echter de deling van gezonde cellen, bijvoorbeeld in het haar of de huid, worden met deze vorm van therapie ook verstoord wat leidt tot nare bijwerkingen zoals misselijkheid en haaruitval. Bovendien zijn deze vormen van therapie niet altijd effectief of wordt de tumor resistent tegen de therapie.

Om de effectiviteit van therapie te verhogen en de bijwerkingen van chemo- en radiotherapie te verminderen is de laatste jaren veel aandacht besteed aan nieuwe therapeutische benaderingen. Een nieuwe benadering is 'targeted therapy'. Daarbij wordt een geneesmiddel ontwikkeld, die kan aangrijpen op structuren specifiek aanwezig op tumorcellen en niet, of in mindere mate, aanwezig op gezonde cellen.

Een voorbeeld van een geneesmiddel dat aangrijpt op zo'n specifieke structuur is een tyrosine kinase remmer van de epidermale groei factor receptor (EGFR). EGFR is in overmaat aanwezig op

tumorcellen van verschillende tumoren, waaronder op die van longtumoren. EGFR is een eiwitstructuur aanwezig op de buitenkant van cellen, en is in staat signalen door te geven naar de binnenkant van de cel om daar verschillende processen te reguleren. In gezonde cellen is EGFR verantwoordelijk voor het doorgeven van signalen voor een goede huishouding in de cel en tevens is dit eiwit belangrijk bij de embryonale ontwikkeling.

Wanneer patiënten met longkanker worden behandeld met EGFR tyrosine kinase remmers (EGFR TKIs) respondeert slechts 10% van de patiënten met verminderde groei of verdwijning van de tumor. Deze patiënten vertonen overigens weinig bijwerkingen van de therapie. Aangezien deze therapie dus maar bij een klein deel van de patiënten aanslaat is het belangrijk te onderzoeken welke eigenschappen van de tumor of de patiënt zijn gerelateerd aan een goede respons, om op deze manier het geneesmiddel zo effectief mogelijk te kunnen toepassen. Verschillende studies hebben uitgewezen dat patiënten met een goede respons voornamelijk bestonden uit vrouwelijke niet-rokers van Aziatische afkomst met het adenocarcinoma subtype. Op moleculair niveau, werd in het jaar 2004 ontdekt dat specifieke mutaties in het EGFR gen van tumorcellen was gerelateerd aan een goede respons op de EGFR tyrosine kinase remmers (EGFR TKIs). EGFR mutaties zouden dus gebruikt kunnen worden, in combinatie met de klinische eigenschappen van de patiënt als 'biomarkers', om de respons van de EGFR TKIs te voorspellen.

Helaas zijn weinig situaties helemaal zwart-wit en bestaat er altijd een grijs gebied. Zo is de correlatie tussen respons op EGFR TKIs en de aanwezigheid van EGFR mutaties niet 100%. Patiënten zonder mutaties kunnen alsnog reageren en ook patiënten met mutaties hebben de kans niet te reageren. Om deze reden wordt veel onderzoek verricht naar het vinden van additionele 'biomarkers' om respons of resistentie voor EGFR TKIs te voorspellen. Zo hebben verschillende onderzoeksgroepen aangetoond dat het aantal EGFR kopieën van het DNA een betere biomarker is voor respons op EGFR TKIs. Verder is gebleken dat mutaties in een ander gen, KRAS, juist verantwoordelijk zijn voor primaire resistentie tegen EGFR TKIs. Bovendien vertonen sommige patiënten na een initiële respons op een EGFR TKI, secundaire resistentie tegen dit geneesmiddel. In 50% van de gevallen kan dit worden verklaard door een tweede mutatie in het EGFR gen, de zogenaamde T790M mutatie. Verder is recentelijk gebleken dat een verhoogd aantal kopieën van het eiwit MET hiervoor ook verantwoordelijk kan zijn.

Uit bovenstaande feiten blijkt dat er goede vooruitgang wordt geboekt met het vinden van biomarkers voor voorspelling van respons op EGFR TKIs. Echter, hiermee worden minder dan 10% van de patiënten geholpen. Het is belangrijk dat er ook biomarkers worden gevonden die kunnen voorspellen hoe een patiënt op bijvoorbeeld chemotherapie zal reageren. Ook is het van belang biomarkers te ontdekken die kunnen voorspellen wat de prognose van de patiënt is, om aan de hand daarvan therapie aan te kunnen passen.

Een krachtige techniek om nieuwe genen te identificeren die belangrijk kunnen zijn in verschillende ziektes is 'microarray'. Bij deze techniek wordt het DNA of RNA van tumorcellen gelabeld met bijvoorbeeld een rode kleurstof en DNA of RNA van een referentie (bijvoorbeeld een pool van tumor cellijnen) met een groene kleurstof. Vervolgens wordt het mengsel van deze gelabelde DNA of RNA samples op een microarray gepipetteerd. De microarray gebruikt voor ons onderzoek, bestaat uit een microscoop glaasje waarop chemische structuren zijn geprint die overeenkomen met de genen op onze chromosomen. Het DNA of RNA zal specifiek aan deze gen-eigen chemische structuren binden onder experimentele condities. Vervolgens kan worden gemeten hoe sterk de rode (tumor) of groene (referentie) kleurstof heeft gebonden en zo kan de hoeveelheid DNA of RNA van alle genen worden gemeten. Wanneer men bijvoorbeeld wilt onderzoeken welke genen verantwoordelijk zijn voor een goede respons op een specifieke therapie, of welke genen voorspellend zijn voor een lange overleving, kan men deze techniek toepassen. Zo kan de genexpressie (RNA) of het aantal DNA kopieën worden gemeten in twee groepen patiënten met verschillende respons op een bepaald geneesmiddel. Wanneer een groep patiënten die goed heeft gereageerd op de therapie significante verschillen vertoont, in RNA expressie of aantal DNA kopieën, met patiënten die niet hebben gereageerd kunnen deze genen of delen DNA verantwoordelijk zijn en nader worden onderzocht.

Het onderzoek beschreven in dit proefschrift omvat een nader onderzoek naar biomarkers in longkanker voor voorspelling van respons en prognose. In hoofdstuk 1 wordt een algemene inleiding gegeven over longkanker en de verschillende behandelmethoden. Er wordt hier tevens dieper ingegaan op EGFR en het gebruik van EGFR tyrosine kinase remmers in de kliniek, tevens wordt de microarray techniek geïntroduceerd en de verschillende studies reeds uitgevoerd met deze techniek worden samengevat.

In hoofdstuk 2 wordt een klinische studie beschreven waarbij het middel Erlotinib (een EGFR TKI) wordt getest op longkanker patiënten. Van deze patiënten is ook bepaald of EGFR of KRAS mutaties aanwezig waren. Deze studie heeft bevestigd dat er een significante relatie bestaat tussen respons op de EGFR TKI en de aanwezigheid van EGFR en KRAS mutaties.

Zoals eerder genoemd bestaan er altijd uitzonderingen, een van deze uitzonderingen wordt in detail beschreven in hoofdstuk 3. Hier wordt een mannelijke, westerse patiënt met longkanker beschreven die is behandeld met een EGFR TKI. Deze patiënt heeft eerder gerookt en het squamous cel carcinoma subtype en geen EGFR mutaties. Hoewel dit precies alle karakteristieken zijn die niet gerelateerd zijn aan respons op EGFR TKIs, vertoonde deze patiënt een goede respons op Erlotinib. Dit hoofdstuk benadrukt dus dat er additionele biomarkers gevonden moeten worden om respons op EGFR TKIs te voorspellen.

Bij patiënten met longkanker kan het voorkomen dat er meerdere tumoren binnen een persoon ontstaan. De diagnose of het gaat om verschillende primaire tumoren of om een metastase van

een primaire tumor, kan belangrijk zijn bij de keuze voor de juiste behandelwijze. In hoofdstuk 4 worden drie patiënten beschreven waarin verschillende tumoren aanwezig waren. In dit hoofdstuk wordt beschreven hoe het gebruik van EGFR en KRAS mutatie analyse in combinatie met de microarray techniek kunnen bijdragen aan het bepalen van de moleculaire relatie tussen verschillende tumoren binnen één patiënt.

Er wordt momenteel veel aandacht besteed aan het vinden van de meest optimale techniek om EGFR en KRAS mutaties te bepalen. In hoofdstuk 5 wordt een studie beschreven waarin de meest gebruikte techniek, PCR en sequenzen, wordt vergeleken in monsters die verschillend gefixeerd en opgeslagen zijn geweest. Ook wordt vergeleken hoe de analyse verschilt met het gebruik van DNA of RNA als uitgangsmateriaal. Er wordt geconcludeerd dat het ideale uitgangsmateriaal RNA is, dat afkomstig is uit een sample die in de stikstof heeft opgeslagen gelegen. Verder worden in dit hoofdstuk aanwijzingen gegeven voor de mutatie analyse van EGFR en KRAS wanneer men niet beschikt over dit type samples.

Zoals eerder genoemd bleek naast EGFR mutaties, ook het aantal EGFR kopieën in het DNA van tumorcellen een goede voorspeller voor respons op EGFR TKIs te zijn. In hoofdstuk 6 beschrijven wij een vergelijkingsstudie naar twee verschillende technieken om het aantal EGFR kopieën in patiënten aan te kunnen tonen. We vergeleken de veel gebruikte techniek, fluorescente in situ hybridisatie (FISH) met een chromogene in situ hybridisatie (CISH). Wij tonen hier aan dat CISH een goed alternatief kan zijn voor FISH om het aantal EGFR kopieën te bepalen, CISH heeft bovendien een aantal praktische voordelen ten opzichte van FISH.

Er zijn verschillende EGFR mutaties gevonden in patiënten maar niet alle typen mutaties laat een even goede relatie zien met respons op EGFR TKIs. Zo is er bijvoorbeeld de eerder genoemde T790M mutatie die juist samengaat met secundaire resistentie. In hoofdstuk 7 beschrijven wij een techniek die wij hebben opgezet om op een snelle manier verschillende typen mutaties te onderzoeken op hun gevoeligheid voor EGFR TKIs (of andere geneesmiddelen).

Het feit dat EGFR een belangrijke rol speelt bij de voorspelling op EGFR TKIs bij longkanker patiënten benadrukt dat dit een belangrijk eiwit is in dit type tumoren. EGFR werkt samen met een groot aantal andere eiwitten om signalen door te geven aan de kern van de cel. In hoofdstuk 8 beschrijven wij een studie waarin we in monsters van longkanker patiënten hebben gekeken naar verschillende EGFR gerelateerde eiwitten. We hebben onder andere EGFR mutaties, KRAS mutaties en het aantal EGFR kopieën in het DNA bepaald. Wij beschrijven een statistisch model om de prognose van de patiënten te voorspellen aan de hand van de verschillende EGFR gerelateerde eiwitten. Wij vergelijken het systeem dat momenteel wordt gebruikt om prognose van de patiënt te bepalen, het zogenaamde pTNM systeem, met het gebruik van de EGFR gerelateerde moleculaire markers. Wij tonen aan dat met de moleculaire markers, een 7-10% betere nauwkeurigheid wordt bereikt om prognose van longkanker patiënten te bepalen, dan

wanneer het pTNM systeem wordt gebruikt. Hoewel dit geen schokkende verbetering is, tonen we aan dat een combinatie analyse als hier beschreven een geschikte methode kan zijn om prognose van patiënten beter te kunnen voorspellen.

Zoals blijkt uit vele studies, is de rol van EGFR in longkanker duidelijk aangetoond. Desondanks, blijft er een groot aantal patiënten waarbij niet bekend is wat de drijvende kracht achter de vorming van de tumor is geweest. We hebben de eerder beschreven microarray techniek gebruikt om additionele genen te identificeren die een rol zouden kunnen spelen in longkanker. Deze studie staat beschreven in hoofdstuk 9. We laten zien dat er 359 genen zijn die mogelijk een belangrijke rol te spelen in longkanker en we focussen in dit hoofdstuk op een van deze genen, HSP90. We tonen aan dat het HSP90 gen een duidelijke correlatie heeft met overleving van patiënten. Patiënten bij wie dit gen in mindere mate aanwezig was, overleefde significant langer dan patiënten waarbij dit gen in hogere mate aanwezig was. Dit kan een aanwijzing zijn dat remming van dit gen het leven van patiënten met longkanker zou kunnen verlengen. Overigens is er al een 'targeted' geneesmiddel tegen dit gen, deze studie benadrukt dus dat dit geneesmiddel ook actief zou kunnen zijn in de behandeling van longkanker patiënten.

Tot slot geven we in hoofdstuk 10 een samenvatting van de studies beschreven in dit proefschrift. Vervolgens bediscussiëren we verschillende aspecten in de context van bestaande literatuur en geven daarmee aanwijzingen voor nader onderzoek in de toekomst.

Het onderzoek omschreven in dit proefschrift laat zien dat er de laatste jaren grote vooruitgang is geboekt met de identificatie van biomarkers bij longkanker patiënten. Vooral in de EGFR targeted therapy hebben EGFR en KRAS mutaties gebleken goede markers te zijn gerelateerd aan respons op EGFR TKIs, hoewel uitzonderingen altijd voor blijven komen. Wij laten in dit proefschrift verder zien dat de microarray techniek een goede techniek is om tot een selectie genen te komen die vervolgens nader bestudeerd zullen moeten worden om hun rol in longkanker uitvoeriger te bestuderen. Met de opkomst van verschillende technieken voor het screenen van zowel DNA, mRNA, niet coderend RNA (microRNAs) als ook eiwitten in tumorcellen, hopen wij in de toekomst een betere kijk te hebben op de moleculaire mechanismen verantwoordelijk voor het ontstaan, aanhouden en uitzaaien van tumoren. Door een juist gebruik van deze verschillende technieken al dan niet in combinatie met elkaar, en door samenwerkingen in de hele wereld, zullen we hopelijk in de toekomst het leven van patiënten met kanker een stuk dragelijker, en in het ideale geval, kankervrij kunnen maken.